研究用試薬

YK253 Human GIP (Total) ELISA

取　扱　説　明　書

FOR　RESEARCH　LABORATORY　USE　ONLY

株式会社　　矢内原研究所

〒418-0011　静岡県富士宮市粟倉 2480-1

FAX: 0544-22-2770　TEL: 0544-22-2771

Website: www.yanaihara.co.jp　E-mail: ask@yanaihara.co.jp

目　　次

Ⅰ. はじめに　2

Ⅱ. 特　　徴　3

Ⅲ. キットの構成　4

Ⅳ. 操作法　5〜6

Ⅴ. 操作上の注意　7

Ⅵ. 基本性能　8〜11

Ⅶ. 貯蔵法および有効期間　12

Ⅷ. 文献　12〜13

YK253 Human GIP (Total) ELISA キット

Ⅰ. はじめに

食事の摂取により、膵臓の β 細胞に作用してインスリンの分泌を促進させる一群の消化管ホルモンとしてインクレチンがあります。このインクレチンには現在、GIP (glucose-dependent insulinotropic polypeptide)と GLP-1 (glucagon-like peptide-1)の 2 種類が知られています。GIP は 1970 年、Brown らによりブタの上部小腸から単離、構造決定された 42 アミノ酸残基からなるポリペプチドです[1)]。ヒト GIP[2)]とブタ GIP[3,4)]はともにアミノ酸配列が類似しており、18 位と 34 位の 2 箇所のアミノ酸残基が異なるのみです。Takeda ら[5)]はヒト GIP 前駆体のアミノ酸配列を解明し、GIP が VIP/グルカゴン/セクレチンファミリーに属するペプチドであることを示唆しました。

GIP は糖や脂肪の摂取により十二指腸の K 細胞から分泌され、膵β細胞に作用してインスリンの分泌を促進します[6)]。健常者では食後に血漿中 GIP の濃度が上昇しますが、インスリン依存性糖尿病の場合は GIP 濃度の上昇が阻害されるといわれています[7)]。GIP 受容体は膵 β 細胞以外にも、十二指腸、小腸、膵α細胞、脂肪細胞、骨芽細胞などさまざまな臓器、細胞に存在しており、GIP が膵臓以外でも多くの生理作用を有している可能性が示唆されています[8,9,10,11)]。

活性型 GIP (1-42) は DPP-4 により血中で分解されて失活し、GIP (3-42) となりますが、この時の血中での半減期は数分程度といわれています。DPP-4 阻害薬は GIP の血中半減期を延ばし、GIP の作用を持続させることができるので、糖尿病の治療効果が期待されています。

本キットは Total GIP [不活性型 GIP (3-42) と活性型 GIP (1-42)]を特異的かつ高感度に測定できます。

YK253 Human GIP (Total) ELISA キット

▼ ヒト total GIP 測定用です。
▼ 3.1～200 pM の範囲で測定できます。
▼ 40 検体を duplicate で測定できます。
▼ 測定は約 3.5 時間で終了します。
▼ 血漿および培養液の測定ができます。
▼ 検体量は 50 μL です。
▼ プレートは１列（8 ウエル）毎に取り外しできますのでキットの分割使用が可能です。

内容
1) 測定プレート
2) 標準品
3) 標識特異抗体液
4) 酵素基質液
5) 酵素反応停止液
6) 緩衝液
7) 濃縮洗浄液
8) プレート密閉用シール

保存と安定性　2～8℃で保存してください。
製造日より 15 ヶ月間は安定です。

Ⅱ．特　　徴

本キットはヒトの血漿および培養液中に含まれる total GIP 濃度を測定するためのものです。本キットによる total GIP の測定は簡便でしかも特異性、定量性に優れ、共存する他の生理活性物質や体液成分の影響を受けにくいなど多くの利点を備えています。なお、添付の標準品 GIP は高純度の合成品（純度 98%以上）であり、表示の重量は絶対量を示しております。

＜特異性＞

本キットは human GIP (1-42)、GIP(3-42) に特異的であり、glucagon、GLP-1 (7-37)、GLP-1 (7-36)NH_2、GLP-1 (9-36)NH_2、human GLP-2 に対する交差反応性をほとんど認めません。

＜測定原理＞

本キットによる測定はサンドイッチ法に基づいて行います。測定プレート（96 ウエル）の各ウエルにはマウス抗 GIP 特異的モノクローナル抗体が固定化されています。この各ウエルに標準液または検体を入れ、抗原抗体複合体を形成させ、さらに HRP 標識化マウス抗 GIP モノクローナル抗体と反応させ、サンドイッチ複合体を形成させます。最後にこの複合体中の HRP 活性を測定することにより、検体中の total GIP を測定することができます。

Ⅲ. キットの構成

試薬・器具	形状	規格		内容物
1.測定プレート		96 ウエルプレート	1 枚	マウス抗 GIP モノクローナル抗体
2.標準品	凍結乾燥品	0.4 pmol	1 本	合成ヒト GIP
3.標識特異抗体液	液状	12 mL	1 本	HRP 標識マウス抗 GIP モノクローナル抗体
4.酵素基質液	液状	12 mL	1 本	3,3’,5,5’-テトラメチルベンジジン (TMB)
5.酵素反応停止液	液状	12 mL	1 本	1M 硫酸溶液
6.緩衝液	液状	25 mL	1 本	反応促進試薬を含む緩衝液
7.濃縮洗浄液	液状	50 mL	1 本	1% Tween 20 を含む濃縮生理食塩液
8.プレート密閉用シール			3 枚	

Ⅳ. 操作法

測定を始める前に必ずお読みください。（注意：キットに含まれるすべての試薬は室温に戻してから測定を始めてください。）

＜使用器具および装置＞

1. マイクロピペットおよびチップ（25 μL～1 mL）；8 連または 12 連のマルチチャンネルピペットの使用を薦めます
2. マイクロプレート用吸光度計（測定波長 450 nm で吸光度 3.0 まで測定できる装置）
3. マイクロプレート用振とう機またはシェーカー
4. 標準液の調製に使用するガラス試験管
5. マイクロプレート洗浄装置、用手法の場合は連続分注器、ニードルディスペンサー、アスピレーターまたは真空ポンプの使用を薦めます
6. メスシリンダー（1000 mL）
7. 蒸留水または脱イオン水

＜試薬の調製＞

1. 標準液の調製法：標準品の容器に緩衝液 1 mL を加え内容物を溶解させ、0.4 pmol/mL (400 pM) の標準液を調製する。この標準液 0.2 mL をとり、これを緩衝液 0.2 mL で希釈し 200 pM の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、100, 50.0, 25.0, 12.5, 6.3, 3.1 pM の各標準液を調製する。0 pM の標準液は緩衝液をそのまま使用する。
   ＜測定範囲＞有効測定範囲　3.1 pM～200 pM
2. 洗浄液の調製法：濃縮洗浄液 50 mL（全量）を蒸留水 950 mL にて希釈し使用する。
3. その他の試薬はそのまま＜測定操作＞に従って使用する。

＜測定操作＞

1. キット内容を室温（20～30℃）に戻す。
   標準液および洗浄液を上記の試薬調製法に従って調製する。
2. 各ウエルに、洗浄液 350 μL を満たした後、アスピレーターにより吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てたあと、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして液を除く。この操作をさらに 2 回繰り返し、合計 3 回の洗浄操作を行う。
3. 各ウエルに緩衝液 50 μL を入れ、ついで標準液 (0, 3.1, 6.3, 12.5, 25.0, 50.0, 100, 200 pM) または検体 50 μL を加える。
4. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で 2 時間振とうする（約 100

rpm）。

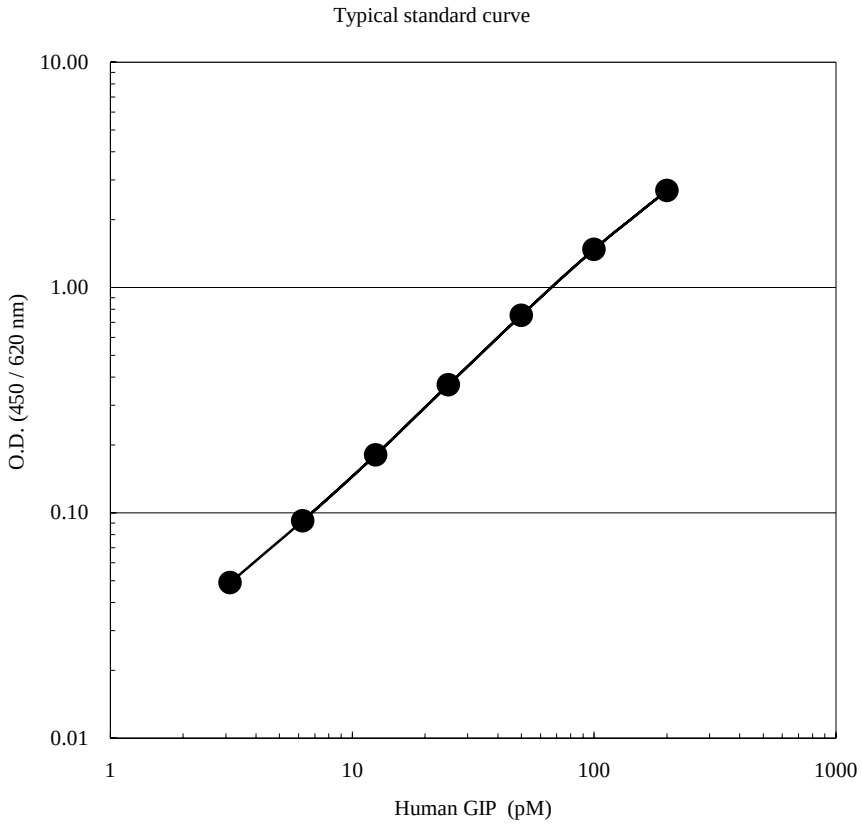
5. 各ウエル中の液を除き、2 . と同様の洗浄操作を合計 4 回行う。
6. 各ウエルに標識特異抗体液 100 μL を加える。
7. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で 1 時間振とうする（約 100 rpm）。
8. 必要量の酵素基質液を使用する約 1 時間前に分取し、遮光しながら室温に戻す。
9. 各ウエル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計 4 回行う。
10. 各ウエルに酵素基質液 100 μL を加え、遮光の状態で室温で静置し 30 分間反応させる。
11. 各ウエルに酵素反応停止液 100 μL を加える。
12. マイクロプレート用吸光度計にて 450 nm/620 nm の吸光度を測定する。
13. 市販のソフトウェアを用いて、5（or 4）－Parameter の回帰式を使用し、GIP 標準液の各濃度の測定値から標準曲線を作成し、検体の GIP 濃度を求める。両対数方眼紙を用いる場合は、横軸に標準液の濃度を、縦軸に標準液各濃度の吸光度をプロットし、標準曲線を作成し、検体の吸光度を標準曲線に当てはめ、GIP の濃度を読み取る。

Ⅴ． 操作上の注意

1. 血液は EDTA-2Na 添加採血管で採取してください。なお、同じ血液検体について YK250 Human GIP (Active) ELISA キットを用いて同時に活性型 GIP (1-42)のみを測定される場合は（本 YK253 キットでは GIP(1-42)と GIP(3-42)の両方を測定）、直ちに DPP-４inhibitor、0.01ml/mL (Catalog No. DPP4 MILLIPORE) を加え、血漿を分離してください。真空採血管には、BD™ P800 GLP-1, GIP, Glucagon, Ghrelin 保存用真空採血管（日本ベクトン・ディッキンソン）も使用できます。直ちに測定できない場合は血漿を適宜小分けして、－30℃以下で凍結保存してください。検体の凍結融解を繰り返さないようにしてください。
2. 試薬は用時調製を原則としてください。特に、標準品は調製後、直ちに使用してください。なお、キットを分割使用する場合、調製後の標準品は適宜小分けして、－30℃以下で凍結保存してください（約 2 ヶ月は安定です）。
3. 濃縮洗浄液は保存中に沈殿を生じることがありますが、この沈殿は希釈調製時に溶解します。
4. 各ウエルへの分注操作は測定精度に影響を与えますので正確に行ってください。また検体をウエルに注入する場合は、検体ごとに新しいチップを用い、検体相互間の汚染がないように注意してください。標準液を希釈するときは、希釈段階ごとに必ず新しいチップを使ってください。
5. 200 pM 超える高値検体の場合は、検体を本キット添付の緩衝液にて希釈して測定してください。
6. 室温での反応には必ずマイクロプレート用振とう機を用い、測定プレートを振とうしてください（呈色反応の場合を除く）。なお振とうはプレート密閉用シールに反応液がはねないようゆっくりと行ってください（約 100 rpm）。
7. 測定はすべて２重測定で行ってください。
8. 酵素-基質反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行ってください。
9. 酵素基質の発色レベルは反応温度、時間、測定プレートの振とうの程度などでわずかですが影響を受けることがありますので、標準曲線は必ず測定ごとに作成してください。
10. 各試薬の保存中もしくは使用中には、これらに強い光が当たらないように注意してください。
11. 本法による測定には、異なるロットのキットを組み合わせて使用しないでください。
12. 酵素基質液は遮光しながら室温に戻し、使用してください。

VI. 基本性能

＜標準曲線の一例＞



＜添加回収試験＞

＜ヒト血漿 A＞

Added GIP (pM)	Observed (pM)	Expected (pM)	Recovery (%)
0	25.8		
4	30.6	29.8	102.7
20	45.5	45.8	99.3
80	95.4	105.8	90.2

＜ヒト血漿 B＞

Added GIP (pM)	Observed (pM)	Expected (pM)	Recovery (%)
0	45.3		
4	49.8	49.3	101.0
20	61.1	65.3	93.6
80	120.3	125.3	96.0

＜ヒト血漿 C＞

Added GIP (pM)	Observed (pM)	Expected (pM)	Recovery (%)
0	26.4		
4	29.4	30.4	96.7
20	44.3	46.4	95.5
80	98.8	106.4	92.9

＜ヒト血漿 D＞

Added GIP (pM)	Observed (pM)	Expected (pM)	Recovery (%)
0	22.7		
4	27.1	26.7	101.5
20	39.8	42.7	93.2
80	92.0	102.7	89.6

＜ヒト血漿 E＞

Added GIP (pM)	Observed (pM)	Expected (pM)	Recovery (%)
0	8.8		
4	11.7	12.8	91.4
20	26.6	28.8	92.4
80	89.5	88.8	100.8

＜希釈試験１＞

＜ヒト血漿 A＞

Sample dilution	Observed (pM)	Expected (pM)	% of Expected (%)
X1	76.3	76.3	
X2	36.5	38.2	95.5
X4	19.0	19.1	99.3
X8	9.7	9.5	102.0

＜ヒト血漿 B＞

Sample dilution	Observed (pM)	Expected (pM)	% of Expected (%)
X1	32.1	32.1	
X2	16.1	16.0	100.2
X4	8.8	8.0	109.5
X8	4.2	4.0	104.6

＜ヒト血漿 C＞

Sample dilution	Observed (pM)	Expected (pM)	% of Expected (%)
X1	45.7	45.7	
X2	22.8	22.9	99.8
X4	13.0	11.4	114.0
X8	6.6	5.7	115.2

＜ヒト血漿 D＞

Sample dilution	Observed (pM)	Expected (pM)	% of Expected (%)
X1	63.5	63.5	
X2	34.5	31.7	108.7
X4	17.4	15.9	109.7
X8	8.9	7.9	111.5

＜ヒト血漿 E＞

Sample dilution	Observed (pM)	Expected (pM)	% of Expected (%)
X1	33.4	33.4	
X2	16.8	16.7	100.4
X4	8.4	8.3	100.4
X8	4.3	4.2	102.6

＜希釈試験２＞食後４０分時の血漿中 GIP (Total) の濃度

＜ヒト血漿 A＞

Sample dilution	Observed (pM)	Concentration (pM))	Mean (pM))
X1	Over		
X2	Over		
X4	Over		
X8	127.6	1020.8	1020.8

＜ヒト血漿 B＞

Sample dilution	Observed (pM))	Concentration (pM))	Mean (pM))
X1	Over		
X2	150.8	301.6	
X4	84.7	338.8	
X8	43.1	344.8	328.4

＜ヒト血漿 C＞

Sample dilution	Observed (pM))	Concentration (pM))	Mean (pM))
X1	Over		
X2	Over		
X4	171.6	686.4	
X8	81.8	654.4	670.4

＜ヒト血漿 D＞

Sample dilution	Observed (pM))	Concentration (pM))	Mean (pM))
X1	Over		
X2	Over		
X4	124.4	497.6	
X8	62.3	498.4	498.0

＜ヒト血漿 E＞

Sample dilution	Observed (pM))	Concentration (pM))	Mean (pM))
X1	Over		
X2	Over		
X4	Over		
X8	100.4	803.2	803.2

＜ヒト血漿 F＞

Sample dilution	Observed (pM))	Concentration (pM))	Mean (pM))
X1	187.4	187.4	
X2	101.0	202.0	
X4	50.2	200.8	
X8	24.9	199.2	197.4

＜交差反応性＞

関連ペプチド	交差反応性（%）
GIP (Human)	100
Glucagon	<0.1
GLP-1 (7-37)	<0.1
GLP-1 (7-36) NH_2	<0.1
GLP-1 (9-36) NH_2	<0.1
Human GLP-2	<0.1

＜再現性試験＞

同時再現性：ヒト血漿　CV(%) 4.7～6.8

日差再現性：ヒト血漿　CV(%) 5.2～5.5

＜測定範囲＞

3.1~ 200 pM

Ⅶ. 貯蔵法および有効期間

＜貯法＞
遮光し、2～8℃にて保存してください。

＜有効期間＞
製造日より 15 ヶ月間（使用期限は外箱に表示）

＜包装＞
１キット 96 テスト分（標準曲線作成用を含む）

Ⅷ. 文　献

1. Brown,J.C., Mutt, V. and Pedersen,R.A. (1970) Further purification of a polypeptide demonstrating enterogastrone activity. *J.Physiol.* **209**, 57-64
2. Moody, A. J., Thim, L. & Valverde, I. (1984) The isolation and sequencing of human gastric inhibitory peptide(GIP). *FEBS Lett*. **172,**142-148.
3. Jörnvall H, Carlquist M, Kwauk S, Otte SC, McIntosh CH, Brown JC, Mutt V. (1981) Amino acid sequence and heterogeneity of gastric inhibitory polypeptide (GIP). *FEBS Lett*. **123**, 205-210.
4. Moody,A.J., Damm Jorgensen, K.and Thim, L.(1981)Diabetologia 21, 306, abstr.
5. Takeda J, Seino Y, Tanaka K, Fukumoto H, Kayano T, Takahashi H, Mitani T, Kurono M, Suzuki T, Tobe T, et al.(1987) Sequence of an intestinal cDNA encoding human gastric inhibitory polypeptide precursor. Proc *Natl Acad Sci U S A.* **84**(20):7005-8.
6. Pederson, R.A. (1994) in Gut Peptides: Biochemistry and Physiology, eds, Walsh, J.H.& Dockray, G.J. (Raven, New York), pp,217-260
7. Krarup T, Madsbad S, Moody AJ, Regeur L, Faber OK, Holst JJ, Sestoft L.(1983) Diminished immunoreactive gastric inhibitory polypeptide response to a meal in newly diagnosed type I (insulin-dependent) diabetics. *J Clin Endocrinol Metab*. **56**, 1306-12.
8. Naitoh R, Miyawaki K, Harada N, Mizunoya W, Toyoda K, Fushiki T, Yamada Y, Seino Y, Inagaki N.(2008) Inhibition of GIP signaling modulates adiponectin levels under high-fat diet in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. **376**, 21-5.
9. Miyawaki K, Yamada Y, Yano H, Niwa H, Ban N, Ihara Y, Kubota A, Fujimoto S, Kajikawa M, Kuroe A, Tsuda K, Hashimoto H, Yamashita T, Jomori T, Tashiro F, Miyazaki J, Seino Y. (1999) Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: a study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96,** 14843-7.

10. Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, Ihara Y, Tsukiyama K, Zhou H, Fujimoto S, Oku A, Tsuda K, Toyokuni S, Hiai H, Mizunoya W, Fushiki T, Holst JJ, Makino M, Tashita A, Kobara Y, Tsubamoto Y, Jinnouchi T, Jomori T, Seino Y.(2002) Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nat Med.* **8**, 738-42.
11. Tsukiyama K, Yamada Y, Yamada C, Harada N, Kawasaki Y, Ogura M, Bessho K, Li M, Amizuka N, Sato M, Udagawa N, Takahashi N, Tanaka K, Oiso Y, Seino Y. (2006) Gastric inhibitory polypeptide as an endogenous factor promoting new bone formation after food ingestion. *Mol Endocrinol.* **20**, 1644-51.

＜お問合せ先＞
株式会社　矢内原研究所
〒418-0011　静岡県富士宮市粟倉 2480-1
FAX:0544-22-2770　TEL:0544-22-2771

www.yanaihara.co.jp　ask@yanaihara.co.jp
2015 年 8 月 31 日改訂